

ИОННЫЕ КАНАЛЫ ПЛАЗМАЛЕММЫ И ТОНОПЛАСТА

Г.Н. Берестовский

*Институт биофизики клетки РАН, Пущино,
факс (0967) 790-509, e-mail: gberest@mail.ru*

Ионные каналы — неотъемлемый элемент всех клеточных мембран. В отличие от других транспортных систем мембран (переносчики, помпы) они способны в открытом состоянии пропускать ионы со скоростью на несколько порядков выше. Это определяет их главенствующую роль в быстрой реакции клетки на внешнее воздействие и в генерации потенциала действия. Более 30 лет основным биофизическим методом изучения функциональных свойств ионных каналов являлся метод фиксации потенциала на клеточной мембране, позволяющий регистрировать интегральные переходные токи. А основным растительным объектом, пригодным для применения этого метода, были гигантские интернодальные клетки харовых водорослей [1]. В этот же период были найдены фармакологические агенты как инструменты исследования ионных каналов.

Последнее десятилетие ознаменовалось прорывом в изучении систем мембранного транспорта, и особенно ионных каналов, благодаря введению новых методов исследования: метода локальной фиксации потенциала (patch clamp method) и методов молекулярной биологии и генной инженерии.

Первый метод позволяет: 1) регистрировать токи одиночных каналов с амплитудой порядка пикоампер; 2) регистрировать токи и потенциалы клеток очень малых размеров (3–10 мкм); 3) исследовать действие фармакологических агентов при быстром подведении их к наружной или внутренней стороне мембраны.

Вторая группа методов дает возможность изучать структурно-функциональную организацию ионных каналов, в том числе определять первичную структуру каналообразующих белков, проводить их биохимическую идентификацию. Важным техническим приемом здесь является клонирование каналоформеров и их экспрессия в гетерологичных системах (например, в ооцитах) для функционального изучения. Уже выявлены, в основном в клетках животных, целые семейства генов, ответственных за синтез того или иного типа каналов. Это позволило

классифицировать каналы не только по их функциональным свойствам (Ca^{2+} -, Na^{+} -, K^{+} -, Cl^{-} -каналы и др.), но и на молекулярном уровне [2]. Установлена большая гомология между структурой соответствующих каналов клеток растений и животных.

Структура наиболее изученных потенциалозависимых катионных каналов имеет общий план строения белковой α -субъединицы, которая предположительно и формирует водную пору канала. У калиевых каналов α -субъединица представляет собой один домен из 6 трансмембранных сегментов (рис. 1, А). α -субъединицы Ca^{2+} - и Na^{+} -каналов содержат по 4 гомологичных домена такого же типа. Каждый 4-й сегмент в домене имеет ряд положительно заряженных аминокислотных остатков. Эти сегменты играют роль сенсора напряжения в канале, в то время как Р-сегменты, находящиеся внутри поры канала, определяют его селективность. Сам канал формируется из 4-х гомологичных α -субъединиц в случае K^{+} -канала или 4-х внутримолекулярных доменов у Ca^{2+} - и Na^{+} -каналов (рис. 1, Б). Семейство K^{+} -каналов отличается большим разнообразием, поскольку канал может формироваться из отличающихся субъединиц, кодируемых разными генами. В состав катионных каналов входят также небольшие добавочные субъединицы, ответственные за модуляцию свойств каналов различными лигандами (АТФ, Ca^{2+} и др.). Наибольшее число таких субъединиц (3) в составе Ca^{2+} -каналов. О молекулярной структуре анионных каналов растительной клетки пока надежных данных не получено.

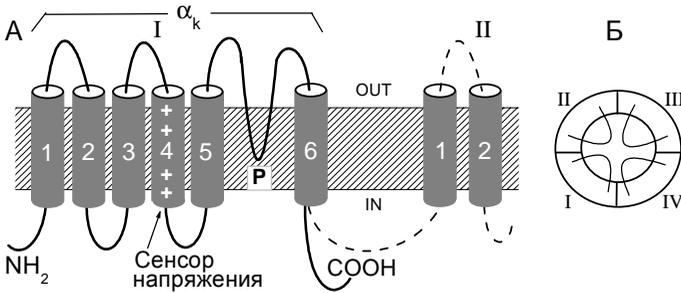


Рис. 1. А. Топология α -субъединиц потенциалозависимых K^{+} - (α_k), Na^{+} - и Ca^{2+} -каналов. α -субъединицы двух последних состоят, в отличие от первого, из 4-х гомологичных доменов (I–IV, показано начало II домена). Б. Предполагаемая тетрамерная структура этих каналов (вид сверху). K^{+} - каналы образуют 4

α_k -субъединицы. Р-сегменты образуют селективный фильтр каналов, а сегменты 4 с положительными зарядами обеспечивают их потенциалозависимость.

Сравнительно недавно обнаружены в клетках животных и растений водные каналы. Образующие их белки (аквапорины) похожи на α -субъединицу K^+ -каналов. Полипептидная цепь аквапорина также понижает мембрану в 6 раз, а ее N- и C-концы располагаются в цитоплазме.

В плазматической и внутриклеточных мембранах растений имеется широкий набор различных каналов, обеспечивающих транспорт всех неорганических ионов (рис. 2 из [2] с модификацией). Последнее обусловлено тем, что наряду с высокоселективными каналами имеются низкоселективные, дискриминирующие ионы в основном по знаку заряда.

Калиевые каналы. В покое разность потенциалов на плазмалемме и тонопласте близка к равновесному калиевому напряжению, определяемому градиентом концентрации этих ионов. Следовательно, некоторые типы K^+ -каналов при потенциале покоя находятся с определенной вероятностью в открытом состоянии. Плазмалемма имеет 2 типа активируемых при деполяризации K^+ -каналов — селективные и низкоселективные. Первые блокируются Cs^+ и тетраэтиламмонием, вторые — хинином. Заметная инактивация отсутствует. Рост концентрации Ca^{2+} в цитоплазме увеличивает вероятность открытого состояния каналов. Обнаружены также K^+ -каналы, активирующиеся при гиперполяризации.

В вакуолярной мембране имеется два типа K^+ -каналов [3]: медленный (МВ) и быстрый (БВ). МВ каналы слабоселективные, пропускают и двухвалентные катионы, в том числе Ca^{2+} . Поэтому их в последнее время стали относить к Ca^{2+} -каналам. Проводимость каналов зависит от объекта. Активируются положительным потенциалом с цитоплазматической стороны, а также цитоплазматическим Ca^{2+} . БВ канал селективен для одновалентных катионов; имеет на порядок меньшую проводимость в открытом состоянии, чем МВ канал; блокируется цитоплазматическим Ca^{2+} . В вакуолях замыкающих клеток устьиц дополнительно обнаружен потенциалонезависимый высокоселективный K^+ -канал.

Кальциевые каналы. Эти каналы играют в клетках ключевую регуляторную роль, поскольку ионы Ca^{2+} являются одним из основных вторичных посредников в сигнальной системе клеток. Из всех типов каналов Ca^{2+} -каналы содержат наибольшее число вспомогательных белковых субъединиц, обеспечивающих множественные пути модуляции функциональных характеристик каналов киназами, фосфатазами и различными лигандами. В плазмалемме растительных клеток обнаружено 2

типа потенциалозависимых Ca^{2+} -каналов с активационно-инактивационной кинетикой: низкой и высокой проводимости. Оба активируются при деполяризации мембраны и, следовательно, участвуют в генерации потенциала действия. Проницаемы также для одновалентных катионов. При потенциале покоя закрыты. Активность зависит от состояния микротрубочек в подмембранном слое цитоплазмы. Недавно обнаружен Ca^{2+} -канал, элиситор-активируемый через соответствующий рецептор.

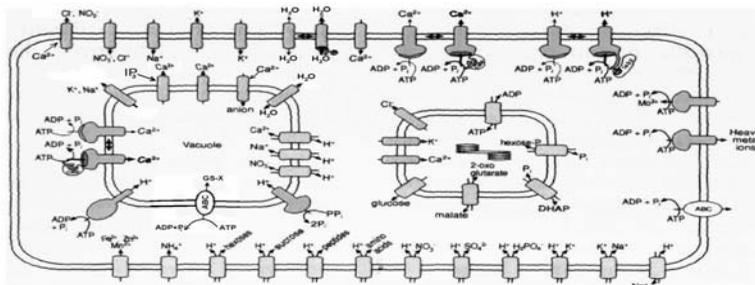


Рис. 2. Системы мембранного транспорта растительной клетки (из [2] с дополнением)

Для ясности указаны только системы плазмалеммы, тонопласта и внутренней мембраны хлоропласта.

Каналы изображены узкими цилиндрами, переносчики — широкими

В тонопласте найдено несколько типов потенциалозависимых слабо-селективных Ca^{2+} -каналов: активируемые положительным потенциалом со стороны цитоплазмы, в том числе упомянутые выше МВ каналы, и каналы с низкой проводимостью, активируемые отрицательным потенциалом. Имеются также группы каналов, активируемых вторичными посредниками — инозит-1,4,5-трифосфатом (IP_3) и циклической АДФ рибозой (с ADPR). Эти каналы пропускают преимущественно двухвалентные катионы. IP_3 -активируемые Ca^{2+} -каналы в тонопласте и эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) участвуют в Ca^{2+} -активируемом выбросе Ca^{2+} из вакуоли и ЭР. Для многих Ca^{2+} -каналов найдены специфические ингибиторы.

Хлорные (анионные) каналы. В соответствии с градиентами концентрации ионов Cl^- в клеточных компартментах Cl^- -каналы обеспечивают выход ионов из цитоплазмы наружу и вход в цитоплазму из вакуоли и хлоропластов. Плазмалемма и тонопласт содержат Ca^{2+} -активируемые

Cl-каналы, выполняющие в ряде объектов, наряду с регуляторной и функцию генерации потенциала действия, а также Cl-каналы, активирующиеся при деполяризации или гиперполяризации мембран. Недавно в тонопласте клеток устьиц обнаружены Cl-каналы, активируемые Ca^{2+} -зависимой протеинкиназой. Ряд Cl-каналов активируется дополнительно АТФ. В большинстве Cl-каналы более проницаемы для NO_3^- , чем для Cl⁻.

Анализ последних экспериментальных данных по всем мембранным транспортным системам растений [2] свидетельствует, что за последние годы достигнуты впечатляющие успехи в изучении их структурно-функциональной организации и механизмов регуляции, и что эти исследования находятся на подъеме.

Литература

1. **Tester M.** Plant ion channels: whole-cell and single — channel studies // *New Phytol.* 1990. V. 114. P. 305–340.
2. Plant membrane transporters: structure, function and regulation (Reviews) // *Biochim. Biophys. Acta.* 2000. V. 1465. P. 1–361.
3. **Тихонова Л.И.** Ионные каналы вакуолярной мембраны высших растений // *Биологические мембраны.* 1998. Т. 15. № 3. С. 245–258.